



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE  
ARMAZENAMENTO NA MICRODUREZA DO ESMALTE E DA  
DENTINA EM DENTES HUMANOS**

Trabalho submetido por  
**Andréa Cristine Magni Teixeira Amaral**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2014**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE  
ARMAZENAMENTO NA MICRODUREZA DO ESMALTE E DA  
DENTINA EM DENTES HUMANOS**

Trabalho submetido por  
**Andréa Cristine Magni Teixeira Amaral**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Pedro Melo e Moura**

**Outubro de 2014**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Doutor Pedro Moura, pela ajuda e a disponibilidade demonstrada durante a elaboração do projecto de investigação e pela amabilidade com que sempre me recebeu.

Ao Professor Doutor Mário Polido, pelo apoio e esclarecimento nas questões laboratoriais.

Ao corpo docente do ISCSEM, por partilharem os seus conhecimentos e experiências.

Aos meus pais, pelos valores incutidos, pelo exemplo que são e por dedicarem a vida à formação e educação dos filhos. Devo-lhes tudo aquilo que sou.

Ao meu irmão, pelo carinho e força transmitida e aos meus sobrinhos Beatriz, Romário e Letícia, pelas palavras e gargalhadas que me ajudam a esquecer a distância.

Ao André Clemente, pela sua devoção, por apelar ao meu bom senso e cuja presença tem sido fundamental nos últimos nove anos.

Às minhas amigas do curso de Ciências Farmacêuticas, Ana Cláudia Brites, Cláudia Cebola, Sara Morais e Sara Moreira, com as quais iniciei este percurso académico, pelo companheirismo e por todos os nossos bons momentos.

À Vera Oliveira, pelas palavras de ânimo e motivação, por todos os conselhos e pela forte amizade que nos une.

À Inês Guerreiro, pela confiança que depositou em mim e pelo empenho, dedicação e cumplicidade neste dois anos de prática clínica.

Aos restantes familiares e amigos, pelo apoio e incentivo e pelo interesse demonstrado ao longo destes anos.

*A todos, um sincero Obrigada!*



## RESUMO

**Introdução:** Vários são os estudos sobre materiais dentários que usam dentes humanos previamente extraídos, os quais são colocados em soluções de armazenamento de forma a prevenir a sua desidratação. No entanto, os meios em que os dentes são armazenados podem interferir nas propriedades físicas e ópticas dos mesmos, levando a alterações nos resultados dos estudos experimentais.

**Objectivo:** Assim sendo, este trabalho tem como objectivo avaliar as possíveis alterações de microdureza do esmalte e da dentina após armazenamento em água destilada, azida sódica a 0,2%, cloramina T a 0,5% e timol a 0,1%.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizados 40 dentes hígidos previamente extraídos por motivos ortodônticos ou doença periodontal. Após extracção, procedeu-se à remoção de restos orgânicos através da curetagem. Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ( $n=4$ ) e armazenados durante 3 meses a 5°C, nas seguintes soluções: G1 = água destilada (grupo controlo); G2 = azida sódica a 0,2%; G3 = cloramina T a 0,5%; G4 = timol a 0,1%; Decorrido o prazo de armazenamento, os dentes foram submetidos ao teste de Vickers, avaliando a microdureza do esmalte e da dentina.

**Resultados:** As médias da microdureza do esmalte e da dentina foram, respectivamente: G1: 302,46 e 62,10 VHN; G2: 315,12 e 61,81 VHN; G3: 359,68 e 61,62 VHN; G4: 321,82 e 59,07 VHN. A análise estatística revelou que os meios de armazenamento usados neste estudo alteram principalmente a microdureza do esmalte ( $p=0,030$ ), sem influenciar significativamente a microdureza da dentina ( $p=0,605$ ).

**Conclusão:** Este estudo demonstrou que os meios de armazenamento podem apenas alterar a microdureza do esmalte.

**Palavras-chave:** Esmalte; Dentina; Meios de armazenamento; Microdureza





## ABSTRACT

**Introduction:** Several studies of dental materials were developed using extracted human teeth which are placed in storage solutions to prevent dehydration. However, the solutions in which the teeth are stored may interfere with their physical and optical properties, leading to changes in the results of experimental studies.

**Purpose:** Therefore, this study aims to evaluate the possible changes in enamel and dentin microhardness after storage in distilled water, 0,2% sodium azide, 0,5% chloramine T and 0,1% thymol.

**Material and Methods:** 40 freshly healthy teeth, extracted for orthodontic reasons or periodontal, disease were used. After extraction, all the organic debris were removed by curettage. The teeth were randomly divided into four groups ( $n = 4$ ) and stored for 3 months at 5°C in the following solutions: G1 = distilled water (control group); G2 = 0,2% sodium azide; G3 = 0,5% chloramine T; G4 = 0,1% thymol. After the period of storage, the teeth have been submitted to Vickers hardness test to evaluate the microhardness of enamel and dentin.

**Results:** The average microhardness of the enamel and the dentin were, respectively: G1: 302,46 and 62,10 VHN; G2: 315,12 and 61,81 VHN; G3: 359,68 and 61,62 VHN; G4: 321,82 and 59,07 VHN. Statistical analysis revealed that the storage solutions used in this study have mainly changed the microhardness of enamel ( $p=0,030$ ), without significantly affecting the microhardness of dentin ( $p=0,605$ ).

**Conclusion:** It has been found that storage solutions only change the microhardness of the enamel.

**Keywords:** Enamel; Dentin; Storage Solutions; Microhardness



## RÉSUMÉ

**Introduction:** Nombreuses sont les études menées sur les matériaux dentaires qui utilisent des dents humaines récemment extraites, puis placées dans des solutions de conservation, afin d'empêcher leur déshydratation. Cependant, ces solutions peuvent interférer avec les propriétés physiques et optiques des dents, ce qui conduit à des changements au niveau des résultats des études expérimentales.

**Objectif:** Ainsi, la présente étude a pour but d'évaluer les possibles changements de la microdureté de l'émail et de la dentine après avoir conservé les dents dans de l'eau distillée, de l'azide de sodium 0,2%, de la chloramine T 0,5% et du thymol 0,1%.

**Matières et Méthodes:** 40 dents intactes fraîchement extraites pour des raisons orthodontiques ou maladie parodontale ont été utilisées. Après leur extraction, on a procédé à l'élimination des résidus organiques à travers du surfaçage radiculaire. Les dents ont été divisées de façon aléatoire en quatre groupes ( $n=4$ ), puis conservées pendant 3 mois à 5°C, dans les solutions suivantes: G1 = eau distillée (groupe contrôle); G2 = azide de sodium 0,2%; G3 = chloramine T 0,5%; G4 = thymol 0,1%. Une fois la période de conservation échouée, les dents ont été soumises à l'essai de dureté Vickers, afin d'évaluer la microdureté de l'émail et de la dentine.

**Résultats:** Les valeurs moyennes de la microdureté de l'émail et de la dentine obtenues ont été, respectivement : G1: 302,46 et 62,10 VHN; G2: 315,12 et 61,81 VHN; G3: 359,68 et 61,62 VHN; G4: 321,82 et 59,07 VHN. L'analyse statistique a démontré que les solutions de conservation utilisées pour cette étude altèrent essentiellement la microdureté de l'émail ( $p=0,030$ ), sans influencer de façon significative la microdureté de la dentine ( $p=0,605$ ).

**Conclusion:** On a constaté que les solutions de conservation peuvent influencer uniquement la microdureté de l'émail.

**Mots-clés:** Émail; Dentine; Milieux de conservation; Microdureté



## ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO .....	21
1.1.	Características gerais dos dentes .....	21
1.1.1.	Esmalte .....	22
1.1.2.	Dentina .....	22
1.2.	Avaliação da dureza .....	22
1.2.1.	Testes de microdureza .....	23
1.2.2.	Microdureza do dente .....	26
1.3.	Meios de armazenamento .....	27
II.	OBJECTIVOS: .....	29
III.	MATERIAIS E MÉTODOS: .....	31
3.1.	Preparação das amostras .....	31
3.2.	Medição do pH das soluções .....	32
3.3.	Medição da microdureza do esmalte e da dentina .....	32
3.4.	Análise estatística .....	35
IV.	RESULTADOS .....	37
4.1.	Caracterização da amostra .....	37
4.2.	Medição do pH das soluções .....	37
4.3.	Medição da microdureza do esmalte .....	37
4.4.	Medição da microdureza da dentina .....	39
4.5.	Análise estatística .....	40
4.5.1.	Avaliação microdureza do esmalte .....	40
4.5.2.	Avaliação microdureza da dentina .....	42
V.	DISCUSSÃO .....	45
VI.	CONCLUSÃO .....	53
VII.	BIBLIOGRAFIA .....	55
ANEXO		



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema de um dente e dos seus tecidos de suporte em vista transversal (adaptado de: Anusavice <i>et al.</i> , 2013, p.6) .....	21
<b>Figura 2</b> - Formas da ponta do indentador (em cima) e formas da indentação (em baixo) dos testes de dureza de Brinell, Rockwell, Vickers e Knoop (adaptado de: Anusavice <i>et al.</i> , 2013, p.6).....	23
<b>Figura 3</b> - Dentes armazenados em água destilada.....	31
<b>Figura 4</b> - Dentes armazenados em azida sódica a 0,2% .....	31
<b>Figura 5</b> - Dentes armazenados em cloramina T a 0,5% .....	31
<b>Figura 6</b> - Dentes armazenados em timol a 0,1% .....	31
<b>Figura 7</b> - Medidor de pH Crison Basic 20 .....	32
<b>Figura 8</b> - Shimadzu HSV-30.....	32
<b>Figura 9</b> - Teste de microdureza de Vickers ao esmalte.....	33
<b>Figura 10</b> - Nivelção da superfície de esmalte.....	33
<b>Figura 11</b> - Indentação na dentina .....	34
<b>Figura 12</b> - Indentação no esmalte.....	34
<b>Figura 13</b> - Polidora Struers Labopol-4 com disco abrasivo SiC de grão 600.....	34
<b>Figura 14</b> - Indentações equidistantes no esmalte .....	34





## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Microdureza do esmalte (VHN) e desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas no teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD ( $*p \leq 0,05$ ) .....	41
<b>Gráfico 2</b> - Microdureza da dentina (VHN) e desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas no teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD ( $*p \leq 0,05$ ) .....	43
<b>Gráfico 3</b> - Escala de pH das soluções de armazenamento .....	48
<b>Gráfico 4</b> - Valores médios da microdureza do esmalte e da dentina .....	49



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Forma das indentações e respectivas fórmulas paara obtenção dos valores de microdureza, sendo $P$ a carga aplicada em kg e $D$ , $d$ , $d_l$ e $l$ distâncias em mm (adaptado: Callister & Rethwisch, 2014) .....	24
<b>Tabela 2</b> - Valores do pH das soluções.....	37
<b>Tabela 3</b> - Medição da microdureza do esmalte em VHN; cálculo da média e desvio padrão de cada amostra .....	38
<b>Tabela 4</b> - Medição da microdureza da dentina em VHN; cálculo da média e desvio padrão de cada amostra .....	39
<b>Tabela 5</b> - Valores médios, desvião padrão, significância das diferenças de microdureza do esmalte e homogeneidade (a,b) dos diferentes grupos; valores com letras distintas apresentam diferenças significativas ( $*p \leq 0,05$ ).....	40
<b>Tabela 6</b> - Teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD na avaliação da microdureza do esmalte ( $*p \leq 0,05$ ) .....	41
<b>Tabela 7</b> - Valores médios, desvião padrão, significância das diferenças de microdureza da dentina e homogeneidade (a,b) dos diferentes grupos; valores com letras distintas apresentam diferenças significativas ( $*p \leq 0,05$ ).....	42
<b>Tabela 8</b> - Teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD na avaliação da microdureza da dentina ( $*p \leq 0,05$ ) .....	42



## LISTA DE SIGLAS

*ADA – American Dental Association*

g – grama

GPa - Gigapascals

HB ou BHN – valor de dureza de Brinell

HK ou KHN – valor de dureza de Knoop

HV ou VHN – valor de dureza de Vickers

ISCSEM – Instituto Superior de Ciência da Saúde Egas Moniz

*ISO – International Organization for Standardization*

JAC – junção amelo-cimentária

JAD – junção amelo-dentinária

kg - quilograma

N – Newton

mm – milímetro

PBS – *phosphate-buffered saline* (soro fisiológico com tampão fosfato)

RHN – valor de dureza de Rockwell

*SPSS – Statistical Package for the Social Science*

µm – micrómetro

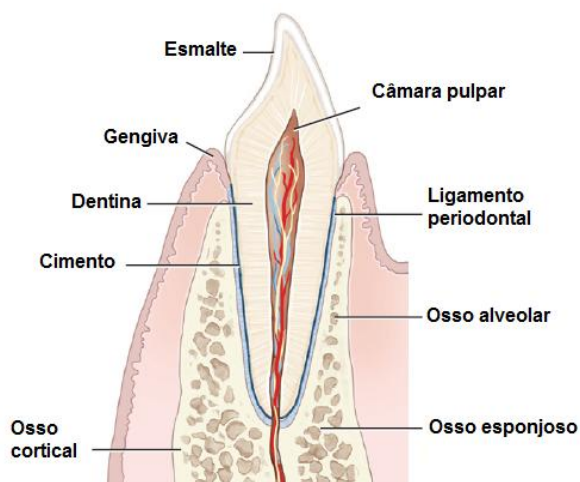


## I. INTRODUÇÃO

Atendendo à evolução e ao desenvolvimento da qualidade dos materiais dentários, têm surgido novos produtos no mercado. De forma a avaliar a sua eficácia, os novos materiais são submetidos a diversos testes laboratoriais. Assim, existem vários estudos *in vitro* que usam dentes humanos ou bovinos previamente extraídos. Após a extracção, é importante que os dentes sejam colocados em soluções de armazenamento de modo a prevenir a sua desidratação. No entanto, os meios em que os dentes são armazenados podem interferir nas propriedades físicas e ópticas dos mesmos e, consequentemente, levar a alterações nos resultados dos estudos experimentais (Colombelli *et al.*, 2001; Ghersel *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2004; Humel *et al.*, 2006; Donassollo *et al.*, 2007; Maranhão *et al.*, 2009; Secilmis *et al.*, 2011, 2013).

### 1.1. Características gerais dos dentes

Cada dente é constituído por uma coroa anatómica e uma ou mais raízes. A coroa dentária é revestida pelo esmalte e as raízes pelo cimento (Figura 1). Estes dois tecidos mineralizados unem-se ao nível do colo do dente, na junção amelo-cimentária (JAC). Por de baixo esmalte e do cimento, encontra-se a dentina que circunda a câmara pulpar onde se situa a polpa (Junqueira & Carneiro, 2004; Berkovitz *et al.*, 2009; Chiego, 2013).



**Figura 1** - Esquema de um dente e dos seus tecidos de suporte em vista transversal (adaptado de: Anusavice *et al.*, 2013, p.6)

### **1.1.1. Esmalte**

O esmalte é o tecido mais duro e mineralizado do corpo humano que funciona como uma camada protectora para a dentina e a polpa (Xu et al., 1998; Junqueira & Carneiro, 2004; Chiego, 2013). É composto por 2-4% de matéria orgânica, 96% de matéria inorgânica e água (Junqueira & Carneiro, 2004; Kumar, 2009; Xie *et al.*, 2009; Chiego, 2013; Secilmis *et al.*, 2013).

À semelhança de outros tecidos mineralizados como a dentina, o cimento e o osso, o esmalte é constituído por cristais de hidroxiapatita. Durante a amelogenese, mecanismo que representa a síntese do esmalte, iões como o estrôncio, o magnésio, o chumbo e o fluoreto podem ser incorporados pelos cristais. Os cristais de hidroxiapatita formam prismas, cujo arranjo em grupo influencia as propriedades mecânicas do esmalte (Junqueira & Carneiro, 2004; Chiego, 2013).

### **1.1.2. Dentina**

A dentina é um tecido mineralizado situado entre o esmalte ou o cimento e a polpa. É constituída por 70% de matéria inorgânica, 20% de matéria orgânica e 10% de água. Devido ao seu elevado conteúdo mineral, a dentina é mais dura que o osso (Stack, 1951; Fuentes *et al.*, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004; Kumar, 2009; Chiego, 2013; Secilmis *et al.*, 2011; 2013).

Ao contrário do esmalte, a dentina contém colagénio em constante formação ao longo da vida, providenciando elasticidade ao tecido. A aparência festoneada da junção amelo-dentinária (JAD) promove a retenção mecânica entre o esmalte e a dentina (Stack, 1955; Martin & Boardman, 1993; Kumar, 2009; Chiego, 2013).

## **1.2. Avaliação da dureza**

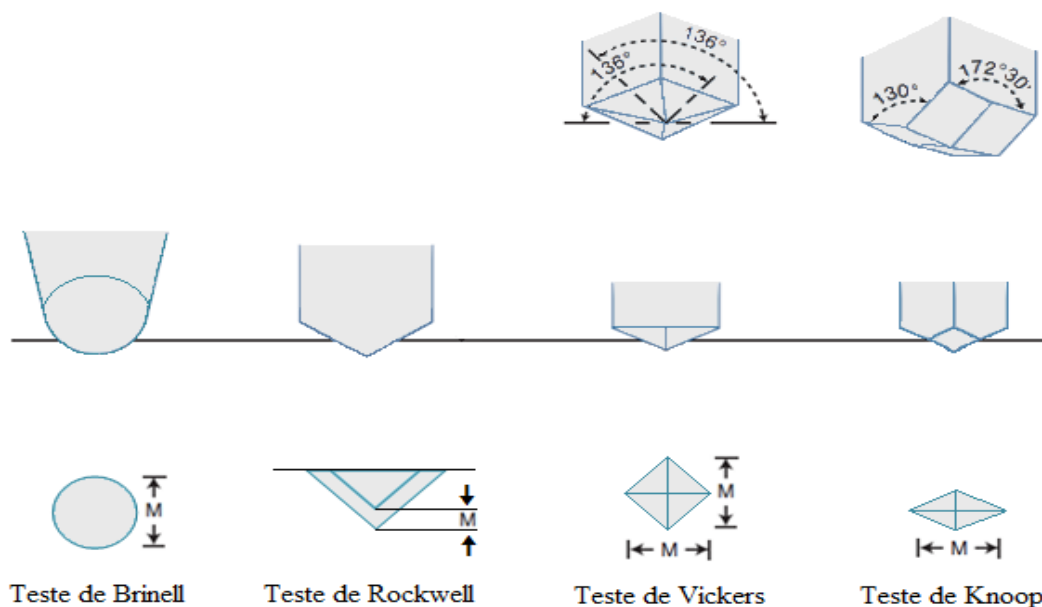
A dureza representa a resistência de um material à deformação plástica medida sob uma carga de penetração (Mecholsky, 1995; Anusavice *et al.*, 2013). É calculada pela força exercida na superfície do material e a dimensão da indentação resultante (Low *et al.*, 2008; Callister & Rethwisch, 2014).



Os testes de microdureza são frequentemente utilizados para estudar tecidos biológicos pois têm em consideração a viscoelasticidade do material testado (Olesiak *et al.*, 2010). Além disso, estes testes estão referenciados em inúmeras especificações de materiais dentários desenvolvidas pela *American Dental Association (ADA)* e fazem parte de diversas normas promovidas pela *International Organization for Standardization (ISO)* (Anusavice *et al.*, 2013).

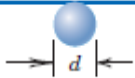
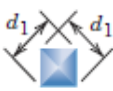
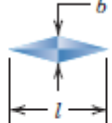
### 1.2.1. Testes de microdureza

A avaliação da microdureza de um material pode ser realizada de várias formas, nomeadamente através de ensaios de penetração, risco e abrasão. O ensaio mais usado na área da medicina dentária é o de penetração, no qual se aplica uma carga específica através de uma ponta diamantada ou uma esfera de aço, formando uma indentação que é medida e convertida num valor de dureza (Tabela 1). Os testes de penetração que podem ser usados para determinar a dureza de um material dentário são conhecidos pelo nome de Brinell, Rockwell, Vickers e Knoop (Figura 2). A selecção do tipo de teste deve ser baseada no tipo de material a ser avaliado (Cuy *et al.*, 2002; Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).



**Figura 2** - Formas da ponta do indutor (em cima) e formas da indentação (em baixo) dos testes de dureza de Brinell, Rockwell, Vickers e Knoop (adaptado de: Anusavice *et al.*, 2013, p.6)

Ao contrário dos testes de Brinell e Rockwell, os testes de Knoop e Vickers são considerados testes de microdureza; podem usar uma carga inferior a 9,8 N e as indentações resultantes são pequenas e com uma profundidade menor que 19 µm, tendo assim a capacidade de medir, em pequenas áreas, a dureza de materiais delgados (Wang et al., 2003; Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

Teste	Forma da indentação	Carga	Fórmula
Brinell		$P$	$HB = \frac{2P}{\pi D[D - \sqrt{D^2 - d^2}]}$
Vickers		$P$	$HV = 1.854P/d_1^2$
Knoop		$P$	$HK = 14.2P/l^2$

**Tabela 1** - Forma das indentações e respectivas fórmulas para obtenção dos valores de microdureza, sendo  $P$  a carga aplicada em kg e  $D$ ,  $d$ ,  $d_1$  e  $l$  distâncias em mm (adaptado: Callister & Rethwisch, 2014)

#### 1.2.1.1- Teste de dureza de Brinell

O teste de Brinell é frequentemente usado para determinar a dureza de metais (ISO 6506-1, 2005). Neste teste, uma esfera de aço ou tungstênio com 10,00 mm de diâmetro comprime a superfície do material sob uma carga constante. A força aplicada pode variar entre 500 e 3000 kg. Ao dividir a carga pela área de indentação obtemos o valor de dureza de Brinell, HB ou BHN (Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

#### **1.2.1.2- Teste de dureza de Rockwell**

O teste de Rockwell pode ser usado para avaliar a dureza de materiais como as cerâmicas (ISO 26443, 2008), metais pesados (ISO 3738-1, 1982) e outros metais (ISO 6508-1, 2005). A ponta do penetrador pode ser um cone diamantado ou uma bola de aço com um diâmetro de 1,588 mm, 3,175 mm, 6,350 mm ou 12,70 mm. De acordo com a carga aplicada, podemos considerar dois tipos de testes: o teste de dureza de Rockwell e o teste de dureza superficial de Rockwell, nos quais são aplicadas forças que variam entre os 10-150 kg e 3-45 kg, respectivamente. Ao invés de medir o diâmetro da indentação, o valor de dureza ou de dureza superficial de Rockwell, RHN, é obtido através da diferença entre a profundidade de penetração de uma carga inicial e a de um carga maior que a anterior (Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

#### **1.2.1.3- Teste de microdureza de Vickers**

O teste de microdureza de Vickers usa os mesmo princípios que o teste de Brinell. No entanto, a ponta tem a forma de uma pirâmide de base quadrada e a área da indentação é calculada através da média das duas diagonais. Assim, ao dividir a carga pela área obtém-se o valor de microdureza de Vickers, HV ou VHN. Neste teste, a força aplicada varia entre 1 e 1000g. Tal como o teste de Rockwell, é usado para determinar a dureza de cerâmicas (ISO 14705, 2008), resinas (ISO 4049, 2009), metais pesados (ISO 3878, 1983) e outros materiais metálicos (ISO 6507-1, 2005) (Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

#### **1.2.1.4- Teste de microdureza de Knoop**

O teste de Knoop usa uma ponta diamantada em forma de pirâmide rombóide, cuja indentação resultante permite-nos obter o valor de dureza de Knoop, HK ou KHN, tal como no teste de Brinell e de Vickers, dividindo a força aplicada pela área da indentação. Contudo, por ser rombóide, a ponta leva a uma recuperação elástica do material após a aplicação da carga, desprezando-se assim o comprimento da diagonal mais curta. À semelhança do teste de Vickers, o teste de Knoop emprega cargas que

variam entre 1 e 1000 g. Para além de avaliar a microdureza de cerâmicas (ISO 14705, 2008), metais pesados (ISO 22394, 2012) e outros metais (ISO 4545-1, 2005), o teste de Knoop também é utilizado para estudar materiais como o vidro e as cerâmicas de vidro (ISO 9385, 1990) (Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

Devido às cargas utilizadas, os testes de microdureza de Knoop e Vickers são adequados para determinar a dureza de materiais friáveis, o que justifica a sua utilidade para a quantificar a dureza das estruturas dentárias (Wang *et al.*, 2003; Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

### **1.2.2. Microdureza do dente**

Nos últimos anos, a avaliação da microdureza do dente tem sido um método usualmente escolhido para estudar as propriedades dos seus tecidos duros, assim como a susceptibilidade do mesmo sofrer um processo de desmineralização aquando submetido a agentes como a nicotina, refrigerantes e bebidas isotónicas, soluções de armazenamento e agentes branqueadores (Colombelli *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2006; Wongkhantee *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2010; Bertoldo *et al.*, 2011; Elfallah & Swain, 2013).

De acordo com estudos publicados, a microdureza do esmalte varia entre 3 e 5 GPa (Meredith *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2008). Segundo Kinney *et al.* (1996), a dentina apresenta valores de microdureza que variam entre 2,2-2,5 GPa na dentina peritubular, 0,49-0,52 GPa na dentina intertubular próxima da junção amelo-dentinária (JAD) e 0,12-0,18 GPa dentina intertubular junto à polpa.

As propriedades mecânicas dos tecidos dentários estão directamente relacionadas com o seu conteúdo mineral, o que justifica a diferença de microdureza entre o esmalte e a dentina (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003; Donassollo *et al.*, 2007; Secilmis *et al.*, 2013).

### 1.3. Meios de armazenamento

Os dentes de origem humana ou bovina usados para estudos *in vitro* são considerados uma fonte potencial de contaminação e infecção. Desta forma, é necessário que estes sejam armazenados em soluções que permitem uma correcta descontaminação e impeçam a sua desidratação, permitindo, desta forma, preservar as suas propriedades, (Moura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Humel *et al.*, 2007; Maranhão *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de meios tem sido usada nos estudos experimentais, tais como a água (destilada, desionizada, com ou sem agentes anti-bacterianos acrescidos), álcool, azida sódica, cloramina T, formol, glutaraldeído, hipoclorito de sódio, saliva artificial, soro fisiológico e timol (Goodis *et al.*, 1991, 1993; Strawn *et al.*, 1996; Araújo *et al.*, 1999; Humel *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2008; Maranhão *et al.*, 2009; Secilmis *et al.*, 2011, 2013).

Contudo, os meios de armazenamento não estão normatizados e os seus efeitos nas estruturas dentárias ainda não são precisos (Santana *et al.*, 2008; Maranhão *et al.*, 2009). No entanto, embora na literatura não esteja descrita nenhuma solução padrão, algumas normas como a ISO/TS 11405:2003 e a ISO 29022:2013 sugerem que os dentes sejam armazenados em Cloramina T a 0,5% ou água destilada.

Para além das soluções, outro factor a ter em conta é o período de tempo em que os dentes são armazenados, podendo ir de algumas horas a vários anos, sendo uma variável muito importante (Colombelli *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006). No entanto, é de salientar que as normas referidas anteriormente preconizam um período máximo de conservação de 6 meses, de forma a prevenir qualquer alteração nos tecidos dentários (ISO/TS 11405,2003; ISO 29022,2013).



## **II. OBJECTIVOS:**

Os objectivos deste estudo consistem em:

- 1) analisar o pH das soluções escolhidas para este trabalho: água destilada, azida sódica a 0,2%, cloramina T a 0,5% e timol a 0,1%;
- 2) determinar se existem diferenças significativas na microdureza do esmalte e da dentina após conservação nas várias soluções
- 3) averiguar se os meios de armazenamento usados influenciam de igual forma a microdureza do esmalte e da dentina.

### **Hipótese nula:**

Os meios de armazenamento não alteram a microdureza do esmalte e da dentina.

### **Hipóteses alternativas:**

Os meios de armazenamento alteram a microdureza do esmalte e da dentina.

Os meios de armazenamento apenas alteram a microdureza do esmalte.

Os meios de armazenamento apenas alteram a microdureza da dentina.



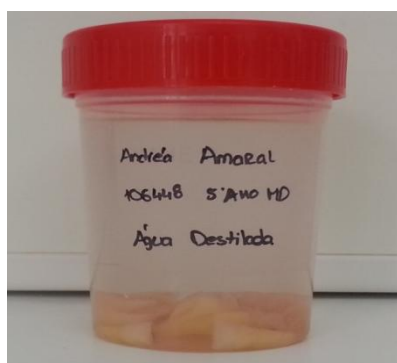


### III. MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1. Preparação das amostras

Após a aprovação por unanimidade do pedido de parecer submetido à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz (anexo 1), procedeu-se à recolha de amostras no Banco de Dentes do ISCSEM. Os doentes assinaram um consentimento informado autorizando a doação dos dentes para o mesmo.

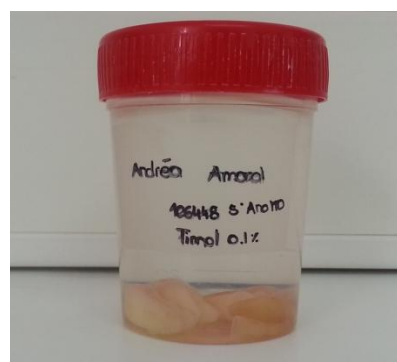
Para a realização deste trabalho, foram seleccionados 40 dentes hígidos previamente extraídos por motivos ortodônticos e/ou periodontais. Após a extracção, procedeu-se à remoção de restos orgânicos através da curetagem. Os dentes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=4) e armazenados durante 3 meses a 5°C, nas seguintes soluções: G1 = água destilada (grupo controlo) (Figura 3); G2 = azida sódica a 0,2% (Figura 4); G3 = cloramina T a 0,5% (Figura 5); G4 = timol a 0,1% (Figura 6).



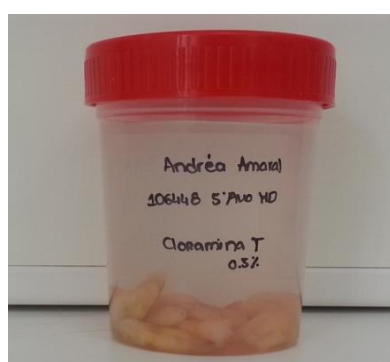
**Figura 3** - Dentes armazenados em água destilada



**Figura 4** - Dentes armazenados em azida sódica a 0,2%



**Figura 5** - Dentes armazenados em cloramina T a 0,5%



**Figura 6** - Dentes armazenados em timol a 0,1%

### **3.2. Medição do pH das soluções**

Os níveis de pH das soluções foram medidos através de um medidor de pH Crison Basic 20 (*Crison Instruments*, Barcelona, Espanha) (Figura 7).



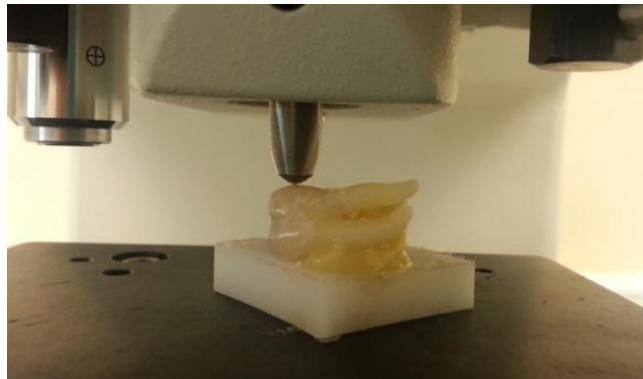
**Figura 7** - Medidor de pH Crison Basic 20

### **3.3. Medição da microdureza do esmalte e da dentina**

Após 3 meses, os dentes foram removidos dos meios de armazenamento e submetidos ao teste de microdureza de Vickers, através da máquina Shimadzu HSV-30 (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão) (Figura 8), para avaliar a microdureza do esmalte e da dentina (Figura 9). A cada avaliação de microdureza foi aplicada uma carga de 29,42 N durante cinco segundos.

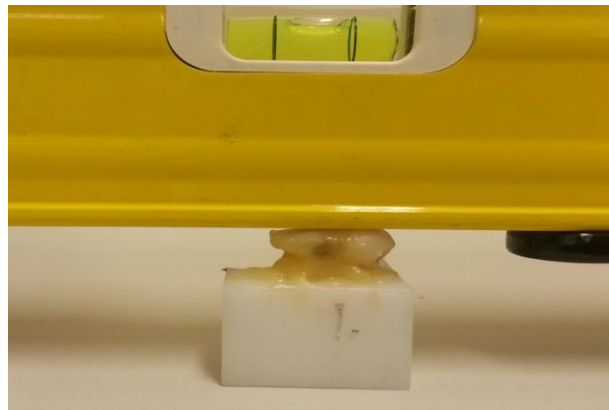


**Figura 8** - Shimadzu HSV-30



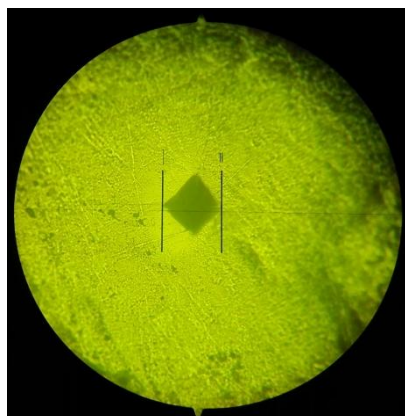
**Figura 9** - Teste de microdureza de Vickers ao esmalte

Tendo em consideração a anatomia dentária, as superfícies seleccionadas para a realização do teste de microdureza foram a face vestibular dos incisivos e as faces mesial ou distal dos molares. Os dentes foram colados com cera a um suporte de base estável, recorrendo ao uso de um nível de bolha, de forma a obter um maior paralelismo (Figura 10).

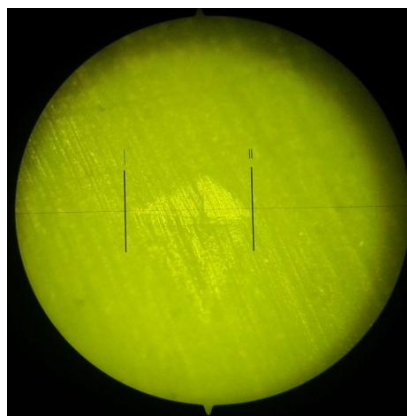


**Figura 10** - Nivelção da superfície de esmalte

Numa primeira fase, procedeu-se à avaliação da microdureza do esmalte (Figura 11). Posteriormente, para avaliar a microdureza da dentina (Figura 12), o esmalte foi desgastado com uma polidora Struers LaboPol-4 (*Struers*, Ballerup, Dinamarca), usando um disco abrasivo SiC de grão 600 (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) (Figura 13).



**Figura 11** - Indentação no esmalte

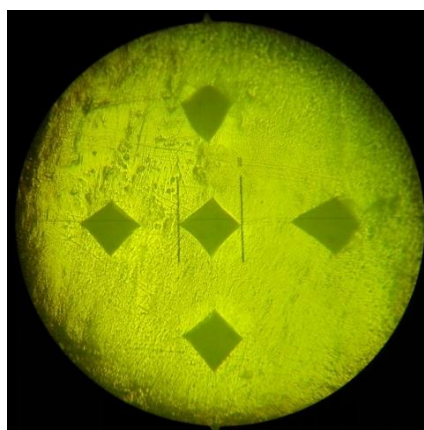


**Figura 12** - Indentação na dentina

Em cada amostra foram realizadas 5 indentações equidistantes no esmalte e na dentina (Figura 14).



**Figura 13** - Polidora Struers Labopol-4 com disco abrasivo SiC de grão 600



**Figura 14** - Indentações equidistantes no esmalte

### **3.4. Análise estatística**

A análise estatística foi efectuada com o programa informático *SPSS*<sup>®</sup> (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0 para Windows<sup>®</sup>.

Fixou-se como referência para aceitar ou rejeitar a hipótese nula um nível de significância ( $\alpha$ )  $\leq 0,05$  (correspondente a 95% de confiança), isto é, as diferenças são significativas quando a probabilidade associada à estatística do teste ( $p$ ) é inferior a 0,05.



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da amostra

A amostra desta investigação é constituída por 40 dentes hígidos previamente extraídos por motivos ortodônticos e/ou periodontais. Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e armazenados durante 3 meses a 5°C em: G1 = água destilada (grupo controlo); G2 = azida sódica a 0,2%; G3 = cloramina T a 0,5% e G4 = timol a 0,1%.

### 4.2. Medição do pH das soluções

Previamente ao período de armazenamento, mediu-se o pH das soluções (Tabela 2).

Grupos	Soluções de armazenamento	pH
G1	Água destilada	6,8
G2	Azida sódica 0,2%	7,34
G4	Cloramina T 0,5%	7,85
G4	Timol 0,1%	6,3

**Tabela 2** - Valores do pH das soluções

### 4.3. Medição da microdureza do esmalte

Após o período de armazenamento, cada dente foi submetido ao teste de Vickers, de modo a avaliar a microdureza do esmalte. Foram realizadas 5 medições no esmalte, com uma carga de 29,42N durante 5 segundo, através das quais se calculou a média e o desvio padrão de cada amostra (Tabela 3).

	Grupos							
	Água destilada		Azida sódica 0,2%		Cloramina T 0,5%		Timol 0,1%	
Amostras (n)	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1	256,6	26,88	248,6	54,01	420,6	52,47	295,4	47,20
2	254	36,93	301,2	33,14	363,8	67,16	343	24,55
3	317	48,45	271	37,95	413,2	54,44	330,2	51,46
4	292,2	36,02	336	39,65	316,6	26,03	257,6	23,13
5	385,6	22,12	282,2	49,27	339	49,48	313,8	45,25
6	293,6	46,90	324	25,43	352,6	33,86	365,8	25,40
7	312,4	48,62	356,2	17,33	327,6	49,14	368,8	46,17
8	353,8	87,98	397,8	28,29	360,8	54,06	277,8	44,10
9	231,8	35,53	351	26,75	393,2	62,12	309,2	30,51
10	327,6	48,08	283,2	27,09	309,4	28,19	356,6	17,01

**Tabela 3** – Medição da microdureza do esmalte em VHN; cálculo da média e desvio padrão de cada amostra



#### 4.4. Medição da microdureza da dentina

Posteriormente, após o desgaste do esmalte, procedeu-se à avaliação da microdureza da dentina (Tabela 4).

	Grupos							
	Água destilada		Azida sódica 0,2%		Cloramina T 0,5%		Timol 0,1%	
Amostras (n)	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1	60,42	6,07	63,94	6,73	72,10	7,90	62,88	2,31
2	54,12	7,77	63,76	3,81	53,42	8,72	57,64	2,60
3	66,46	4,58	63,10	3,45	61,06	3,90	55,04	2,83
4	61,92	1,95	60,38	4,48	67,4	1,30	51,94	3,15
5	58,44	2,99	52,74	2,67	68,56	6,14	57,10	3,80
6	46,22	7,88	64,78	2,34	60,85	1,20	63,74	1,88
7	66,78	1,91	59,98	2,92	56,50	1,92	61,64	2,09
8	67,62	1,87	60,44	2,61	55,92	2,73	61,10	3,44
9	66,58	1,97	64,10	3,97	60,02	2,06	64,22	2,73
10	72,40	3,99	64,88	5,94	60,38	3,50	55,36	4,67

**Tabela 4** – Medição da microdureza da dentina em VHN; cálculo da média e desvio padrão de cada amostra

#### 4.5. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa informático SPSS® versão 20.0 para Windows®.

Para testar as diferenças na microdureza usou-se o teste ANOVA *One-Way* pois estamos a comparar mais de dois grupos e a variável dependente é de tipo quantitativo. Os pressupostos destes testes, nomeadamente o pressuposto de normalidade de distribuição e o pressuposto de homogeneidade de variâncias foram analisados com os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e teste de *Levene*. As diferenças significativas foram analisadas com o teste de comparação múltipla *a posteriori* de *Tukey*, para  $p < 0,05$ .

Para facilitar a análise dos resultados, estes foram divididos de acordo com as estruturas dentárias estudadas (avaliação da microdureza do esmalte e avaliação da microdureza da dentina).

##### 4.5.1. Avaliação microdureza do esmalte

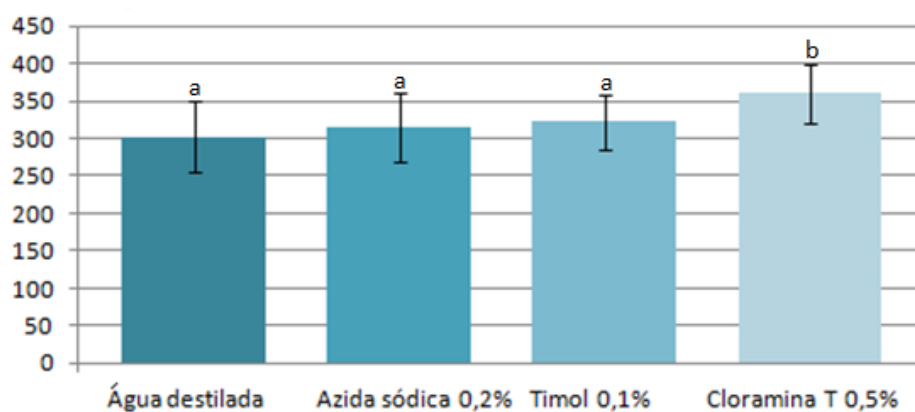
O teste Anova *One-Way* (Tabela 5) demonstrou que os meios de armazenamento usados neste estudo influenciam a microdureza do esmalte ( $p=0,030$ ). Através do teste de comparação múltipla de *Tukey* (Tabela 6) verificamos que existem diferenças significativas entre a água destilada (G1) e a Cloramina T a 0,5% (G3), sendo que os valores de microdureza são mais elevados na Cloramina T a 0,5% (G3) (359,68 VHN vs 302,46 VHN).

	Água destilada	Azida sódica 0,2%	Cloramina T 0,5%	Timol 0,1%	Sig.
Média	302,46 <sup>a</sup>	315,12 <sup>a</sup>	359,68 <sup>a</sup>	321,82 <sup>b</sup>	0,030*
Desvio padrão médio	47,28	45,94	38,88	37,79	

**Tabela 5** – Valores médios, desvio padrão, significância das diferenças de microdureza do esmalte e homogeneidade (a,b) dos diferentes grupos; valores com letras distintas apresentam diferenças significativas (\* $p \leq 0,05$ )

Grupo	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Água destilada	10	302,46	
Azida sódica 0,2%	10	315,12	315,12
Timol 0,1%	10	321,82	321,82
Cloramina T 0,5%	10		359,68
Sig.		,742	,109

**Tabela 6** – Teste *post-hoc* Tukey HSD na avaliação da microdureza do esmalte (\* $p \leq 0,05$ )



**Gráfico 1** - Microdureza do esmalte (VHN) e desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas no teste *post-hoc* Tukey HSD (\* $p \leq 0,05$ )

#### 4.5.2. Avaliação microdureza da dentina

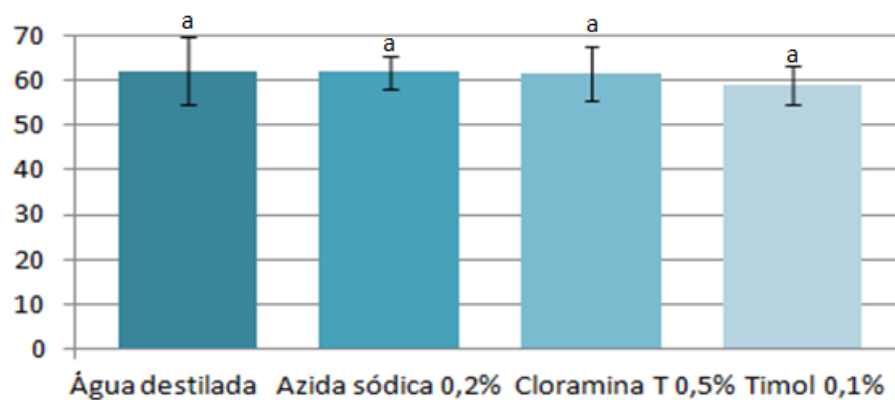
De acordo com o teste Anova *One-Way* (Tabela 7) e o teste de comparação múltipla de Tukey (Tabela 8), a microdureza da dentina é mais elevada na água destilada (G1) e mais baixa no Timol a 0,1% (G4) (62,10 VHN vs 59,07 VHN), embora a diferença não seja estatisticamente significativa,  $F(3, 36) = 0,627, p = 0,605$ .

	Água destilada	Azida sódica 0,2%	Cloramina T 0,5%	Timol 0,1%	Sig.
Média	62,10 <sup>a</sup>	61,81 <sup>a</sup>	61,62 <sup>a</sup>	59,07 <sup>a</sup>	0,605*
Desvio padrão médio	7,67	3,70	5,98	4,22	

**Tabela 7** – Valores médios, desvio padrão, significância das diferenças de microdureza da dentina e homogeneidade (a,b) dos diferentes grupos; valores com letras distintas apresentam diferenças significativas ( $*p \leq 0,05$ )

Grupo	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Timol 0,1%	10	59,07
Cloramina T 0,5%	10	61,62
Azida sódica 0,2%	10	61,81
Água destilada	10	62,10
Sig.		,627

**Tabela 8** – Teste *post-hoc* Tukey HSD na avaliação da microdureza da dentina ( $*p \leq 0,05$ )



**Gráfico 2** - Microdureza da dentina (VHN) e desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas no teste *post-hoc* Tukey HSD ( $*p \leq 0,05$ )



## V. DISCUSSÃO

A importância da hidratação e consequente manutenção das propriedades mecânicas dos tecidos dentários usados nos estudos *in vitro* levaram os investigadores a avaliar os efeitos dos meios de armazenamento nos dentes usados para fins científicos. Segundo alguns autores, estes podem levar a alterações nas propriedades físicas e ópticas do esmalte e da dentina (Ghersel *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2001; Maranhão *et al.*, 2009; Secilmis *et al.*, 2011,2013). Deste modo, várias investigações foram realizadas com o intuito de avaliar os efeitos dos meios de armazenamento nas propriedades dos tecidos dentários, nomeadamente as alterações que estes podem desencadear na adesão, permeabilidade dentinária, infiltração marginal, microdureza e módulo de elasticidade (Goodis *et al.*, 1991, 1993; Araújo *et al.*, 1998; Kitasako *et al.*, 2000; Colombelli *et al.*, 2001; Ghersel *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2006; Humel *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2008; Maranhão *et al.*, 2009; Mobarak *et al.*, 2010).

O presente estudo tinha como objectivo avaliar a influência dos meios de armazenamento na microdureza do esmalte e da dentina, após um período de conservação de 3 meses. À semelhança de outros estudos e seguindo as recomendações das normas ISO/TS 11405:2003 e ISO 29022:2013, os dentes extraídos foram higienizados e armazenados de imediato, para evitar possíveis alterações. As soluções escolhidas foram: G1 = água destilada (grupo controlo); G2 = azida sódica a 0,2%; G3 = cloramina T a 0,5% e G4 = timol a 0,1%. Decorrido o prazo de armazenamento, o esmalte e a dentina de cada amostra foram submetidos ao teste de microdureza de Vickers, sendo este um dos testes mais indicados para avaliar a microdureza dos mesmos. De forma a obter um maior paralelismo e, consequentemente, uns valores mais fidedignos, os dentes foram colados com cera a um suporte de base estável, recorrendo ao uso de um nível de bolha, e as superfícies dentárias analisadas foram a face vestibular dos incisivos e as faces mesial ou distal dos molares, por serem relativamente planas (Wang *et al.*, 2003; Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

Os meios de armazenamento não estão normatizados e os seus efeitos nas estruturas dentárias ainda não são precisos (Santana *et al.*, 2008; Maranhão *et al.*, 2009). Contudo, a selecção das soluções escolhidas para este trabalho foi baseada em vários estudos encontrados na literatura sobre a influência dos meios de armazenamento nas propriedades mecânicas dos tecidos dentários e nas recomendações das normas ISO/TS 11405:2003 e ISO 29022:2013. Estas normas sugerem que os dentes sejam armazenados em Cloramina T a 0,5% ou água destilada num período máximo de 6 meses. A azida sódica a 0,2% e o timol a 0,1% são frequentemente usados como meios de armazenamento nos estudos cujo objectivo é avaliar adesão às estruturas dentárias (Goodis *et al.*, 1991, 1993; Silva *et al.*, 2006; Humel *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2008). Sendo um fenol, a conservação de amostras em timol tem suscitado alguma controvérsia. A norma ISO 29022:2013 desaconselha o uso de aldeídos, por reagirem com o colagénio da dentina, e fenóis, por inibir a polimerização de radicais livres (Samaranayake, 2012). No entanto, vários estudos consideram o timol uma solução apropriada para conservação, pois referem não haver alterações na permeabilidade dentinária, microinfiltração e adesão à dentina, ao contrário do que acontece com o formol (aldeído) (Goodis *et al.*, 1991, 1993; Strawn *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2006; Humel *et al.*, 2009). O timol pode ser usado em várias concentrações; na literatura, diversos estudos experimentais empregam a solução de timol a 0,1% (Humel *et al.*, 2007; Maranhão *et al.* 2009; Secilmis *et al.*, 2011,2013). Soluções que contenham hipoclorito de sódio podem levar a um aumento da porosidade do esmalte e modificar a matriz proteica da dentina, sendo inapropriadas como meio de armazenamento (Moura *et al.* 2004; Samaranayake, 2012).

Como já foi referido, existem vários estudos sobre a influência dos meios de armazenamento nas mais diversas propriedades dos tecidos dentários. No entanto, a maioria dos estudos tem como objectivo avaliar a influência dos meios de armazenamento na adesão, sendo a microdureza uma propriedade ainda pouco explorada, o que demonstra a relevância deste trabalho. Neste sentido, consideramos que é importante a realização de mais estudos que tenham como finalidade determinar as possíveis alterações na microdureza do esmalte e da dentina resultantes dos meios de armazenamento.



Goodis *et al.* (1993) avaliou a influência de várias soluções na adesão e permeabilidade dentinária e verificou que, após um período de armazenamento prolongado (6 meses), o soro fisiológico altera de forma significativa as mesmas propriedades.

Por sua vez, Colombelli *et al.* (2001), avaliou a influência dos meios de armazenamento na microdureza do esmalte e da dentina; utilizou quatro soluções de armazenamento, sendo elas: soro fisiológico, água destilada, formol a 10% e timol a 0,5%, durante um período de 45 a 60 dias. Comparando ao grupo de controle, constituído por 10 terceiros molares que não foram armazenados em qualquer solução, nenhuma das soluções alterou significativamente a dureza do esmalte. A dureza da dentina reduziu significativamente quando armazenada em água destilada e soro fisiológico. Estes resultados diferem dos resultados obtidos no presente estudo, sendo que apenas verificamos alterações de microdureza no esmalte.

Humel *et al.* (2007) estudou a influência dos meios de armazenamento na adesão, usando nomeadamente timol a 0,1%, azida sódica a 0,2%, formol a 10% e cloramina T a 0,5%, e concluiu que apenas o formol a 10% diminui a adesão.

Em contrapartida, Santana *et al.*, (2008) armazenou as amostras em timol a 0,2%, formol a 10% e azida sódica a 0,2%, durante 7 dias, 30 dias e 6 meses, e observou que, após 6 meses, as soluções de timol a 0,2% e formol a 10% influenciaram negativamente a adesão.

Num estudo realizado por Maranhão *et al.* (2009), em que foram usados dentes bovinos, as amostras foram colocadas em: água destilada (grupo de controle), saliva artificial e soro fisiológico, durante 90 dias. A análise com microscopia electrónica revelou que a saliva artificial induziu uma maior precipitação dos sais na superfície do esmalte; o soro fisiológico levou a um aumento da porosidade do esmalte; no timol a 0,1%, a superfície do esmalte apresentou-se plana e polida.

Mobarak *et al.*, (2010) verificou, após armazenamento em Cloramina T a 0,5% e água destilada durante um período de 2 anos, que estes meios não induziram alterações significativas na adesão.

Secilmis *et al.* (2011, 2013) estudou a influência dos meios de armazenamento no conteúdo mineral da dentina e do esmalte usando como soluções: soro fisiológico, água destilada, saliva artificial, timol a 0,1% em água destilada e em PBS, formalina a 10% em água destilada e em PBS e glutaraldeído a 2% em água destilada e em PBS. O grupo de controle era constituído por amostras colocadas a seco, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Verificou que os níveis de cálcio, fosfato, potássio e sódio diminuíram significativamente, concluindo, desta forma, que os meios de armazenamento influenciam o conteúdo mineral do esmalte e da dentina. Segundo o autor, os dentes previamente extraídos são ideais para estudos *in vitro*.

É de salientar a existência de uma falta de consenso por parte de alguns autores nos resultados dos estudos que visam avaliar o efeito do branqueamento dentário nas propriedades mecânicas do esmalte. Estes referem que as discrepâncias nos valores obtidos podem estar associadas à metodologia empregue nos diversos estudos, nomeadamente as soluções usadas para o armazenamento dos dentes (Araújo *et al.*, 2006; Joiner, 2007; Park *et al.*, 2006).

Alguns autores referem que a desmineralização dos tecidos pode aumentar se o pH da solução for baixo. Além disso, a reduzida concentração de iões cálcio e fosfato conduz a um desequilíbrio na transferência dos iões entre a solução e os tecidos mineralizados, levando à dissolução do conteúdo mineral da dentina e do esmalte (Kitasako *et al.*, 2000; Habelitz *et al.*, 2002; Raum *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2008; Secilmis *et al.*, 2011, 2013). No presente estudo, após a medição do pH, verificou-se que as soluções apresentam um pH próximo do valor neutro ( $\text{pH}=7$ ) (Gráfico 3).

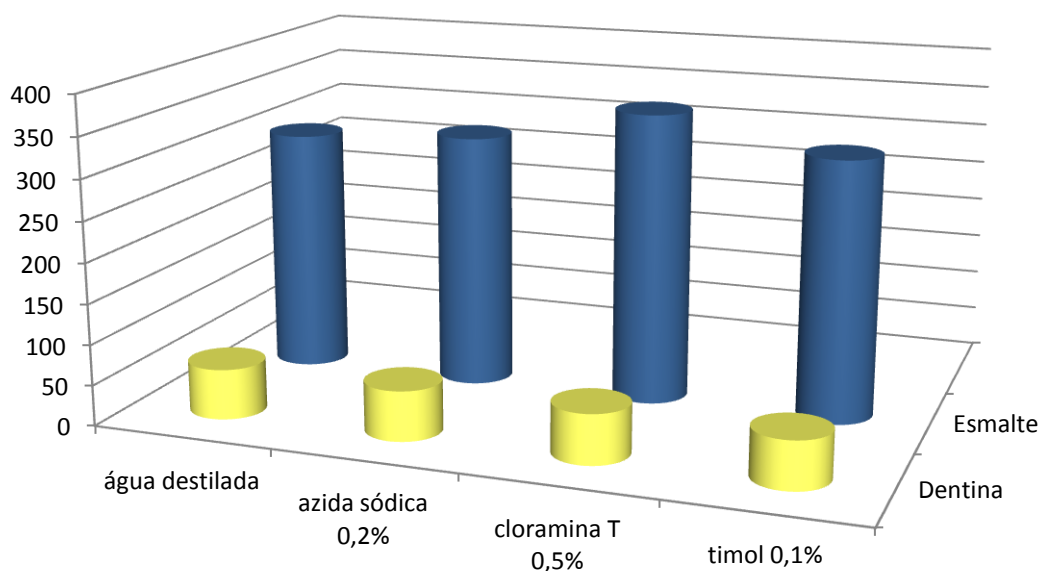


**Gráfico 3** - Escala de pH das soluções de armazenamento

Além das soluções escolhidas como meio de conservação serem essenciais na manutenção da hidratação das amostras, o tempo é considerado por muitos autores uma variável importante. Goodis *et al.* (1991), Strawn *et al.* (1996) e Santana *et al.* (2008)

constataram que o período e o meio de armazenamento levam a um aumento da permeabilidade dentinária. Secilmis *et al.* (2011, 2013) comparou o conteúdo mineral do esmalte e da dentina após 45 dias e 90 dias de conservação, e verificou que houve alterações significativas nos valores de cálcio, fosfato e potássio, os quais diminuíram ao longo do tempo.

No presente estudo, após a avaliação da microdureza do esmalte e da dentina, obtivemos as seguintes médias para os diferentes grupos: G1: 302,46 e 62,10 VHN; G2: 315,12 e 61,81 VHN; G3: 359,68 e 61,62 VHN; G4: 321,82 e 59,07 VHN (Gráfico 4).



**Gráfico 4** - Valores médios da microdureza do esmalte e da dentina

As propriedades mecânicas dos tecidos dentários estão directamente relacionadas com o seu conteúdo mineral, o que justifica a diferença dos valores de microdureza entre o esmalte e a dentina verificada neste trabalho (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003; Donassollo *et al.*, 2007; Secilmis *et al.*, 2013).

A análise estatística dos resultados obtidos neste estudo revelou que apenas existem diferenças significativas na microdureza do esmalte ( $p=0,030$ ), sendo que os valores mais elevados foram encontrados no grupo G3 (cloramina T a 0,5%) e os mais baixos no grupo G1 (água destilada), com uma média de 359,68 VHN e 302,46 VHN,

respectivamente. Contudo, as alterações verificadas na microdureza da dentina entre os 4 grupos experimentais não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,605$ ). Assim, verificamos que os meios de armazenamento usados neste estudo alteram a microdureza do esmalte, sem alterar significativamente a microdureza da dentina.

Presume-se que as diferenças verificadas entre os vários grupos podem estar relacionadas com o pH dos meios de armazenamento usados e as trocas iônicas que ocorrem entre as soluções e o conteúdo mineral dos tecidos dentários (Raum *et al.*, 2007; Secilmis *et al.*, 2011, 2013). É de salientar que o grupo G3 (cloramina T a 0,5%) obteve os valores de microdureza do esmalte mais elevados, sendo a cloramina T a solução que apresentou um pH mais básico que os outros meios. Contudo, seria de esperar que o grupo G4 (timol a 0,1%) apresentasse os valores de microdureza do esmalte mais baixos, uma vez que o seu pH revelou ser mais ácido relativamente às restantes soluções.

Deduz-se que estas alterações não foram observadas na dentina, uma vez que a superfície dentinária analisada se encontrava perto da junção amelo-dentinária (JAD), não havendo um desequilíbrio na transferência dos iões entre as soluções e a dentina superficial (Kitasako *et al.*, 2000; Habelitz *et al.*, 2002; Raum *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2008; Secilmis *et al.*, 2011, 2013).

Porém, as características histológicas e a composição química dos tecidos, a localização e a profundidade da superfície analisada, e ainda os erros de leitura do aparelho são outros factores que podem influenciar os valores de microdureza do esmalte e da dentina. À medida que nos aproximamos da JAD, a microdureza do esmalte diminui. A dentina apresenta maiores valores de microdureza na dentina peritubular que na dentina intertubular, sendo ainda menores junto à câmara pulpar. Uma vez que as propriedades mecânicas dos tecidos calcificados também dependem do seu conteúdo mineral, os dentes decíduos, menos mineralizados, não são ideais para a realização de estudos experimentais (Kinney *et al.*, 1996; Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003; Donassollo *et al.*, 2007; Castanho *et al.*, 2009; Weig *et al.*, 2011; Anusavice *et al.*, 2013; Callister & Rethwisch, 2014).

Na literatura, encontramos uma disparidade nos valores de microdureza. Fuentes *et al.* (2002) estudou a microdureza da dentina superficial e profunda, aplicando cargas de 300g e 500g. Os valores de microdureza da dentina superficial e profunda foram, respectivamente: 61,93 e 62,48 VHN, 63,01 e 61,86 VHN. Por sua vez, Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga (2003) estudaram a composição química e a microdureza do dente, e observaram que os valores de microdureza variam entre 270 e 360 VHN para o esmalte, e entre 50 e 60 VHN para a dentina. Weig *et al.* (2011) avaliou a microdureza e o módulo de elasticidade de várias regiões dos tecidos dentários. Os resultados da microdureza foram os seguintes: 460,9 VHN no esmalte periférico, 371,9 VHN no esmalte central, 338,25 VHN no esmalte junto à JAD; 256,08 VHN na JAD, 105,7 VHN na dentina superficial e 73,08 VHN na dentina peritubular.

Assim, embora a análise estatística tenha revelado que os meios de armazenamento usados neste estudo alteram principalmente a microdureza do esmalte, sem alterar significativamente a microdureza da dentina, verificamos que os resultados obtidos se enquadram no intervalo de valores de microdureza dos tecidos dentários documentados na literatura.

Para além dos meios de armazenamento, pressupõe-se que o período durante o qual as amostras foram conservadas neste estudo (3 meses), influenciou os mesmos resultados, na medida em que o tempo de conservação diminuiu o conteúdo mineral e, consequentemente, a microdureza dos tecidos (Goodis *et al.*, 1991; Strawn *et al.*, 1996; Santana *et al.*, 2008; Secilmis *et al.*, 2011, 2013).



## **VI. CONCLUSÃO**

Atendendo à metodologia e às limitações deste estudo, foi possível concluir-se que:

- Todas as soluções usadas neste trabalho apresentaram um valor de pH próximo do valor neutro (pH=7).
- As diferenças estatísticas foram verificadas na microdureza do esmalte, sendo que os valores mais elevados foram encontrados no grupo G3 (cloramina T a 0,5%) e os mais baixos no grupo G1 (água destilada), com uma média de 359,68 VHN e 302,46 VHN, respectivamente.
- Apesar de na dentina não haver diferenças estatisticamente significativas, observou-se uma tendência para maior dureza em água destilada (62,10 VHN) e menor em timol a 0,1% (59,07 VHN).

Assim, de acordo com os resultados apresentados, aceitamos a hipótese alternativa: os meios de armazenamento apenas alteram a microdureza do esmalte. A hipótese nula foi rejeitada, uma vez que foram demonstradas diferenças significativas na microdureza do esmalte.

Após a conclusão deste estudo, verificamos que o processo de armazenamento é fundamental para prevenir a desidratação das amostras, pois as alterações das propriedades físicas e ópticas resultantes podem influenciar os resultados dos estudos experimentais.





## VII. BIBLIOGRAFIA

- Anusavice, K. J., Shen, C., Rawls, H. R. (2013). *Phillips' Science of Dental Materials*. 12ª edição. St Louis, EUA: Elsevier.
- Araújo, R. M., Araújo, M. A., Silva, R. C., Gonçalves, S. E., Huhtala, M. F., & Rodrigues, J. R. (1999). Influência de diferentes meios de armazenamento de dentes extraídos na infiltração marginal. *Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia*, 3(14), 31-35.
- Araújo, R. M., Torres, C. R., & Araújo, M. A. (2006). Influence of bleaching agents and a carbonated soft drink on dental enamel microhardness as well as the artificial saliva effect on the treated surface. *Revista Odonto Ciência*, 21(52), 118-124.
- Berkovitz, B. K., Holland, G. R., & Moxham, B. J. (2009). *Oral anatomy, histology and embriology*. 4ª edição. Londres, Inglaterra: Elsevier.
- Bertoldo, C. E., Miranda, D. A., Souza-Júnior, E. J., Aguiar, F. B., Lima, D. A., Ferreira, R. L., . . . Claes, I. (2011). Surface hardness and color change of dental enamel exposed to cigarette smoke. *International Journal of Dental Clinics*, 3(4), 1-4.
- Callister Jr, W. D., & Rethwisch, D. G. (2014). *Materials Science and Engineering*. 9ª edição. Danvers, EUA: Wiley.
- Castanho, G. M., Marques, J. B., Camargo, M. A., & De Carga, A. A. (2009). Avaliação *in vitro* da microdureza de dentina bovina normal e esclerosada. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 6(2), 123-128.
- Chiego, D. J. (2013). *Essentials of Oral Histology and Embriology*. 4ª edição. St Louis, EUA: Elsevier.

- Colombelli, C. M., Rosa, D. L., Campregher, U. B., & Samuel, S. W. (2001, Outubro). *Influência dos meios de armazenagem sobre a dureza de esmalte e dentina*. Comunicação apresentada no 11º Salão de Iniciação Científica na UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- Cuy, J. L., Mann, A. B., Livi, K. J., Teaford, M. F., & Weihs, T. P. (2002). Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*, 47(4), 281-291.
- Donassollo, T. A., Romano, A. R., Demarco, F. F., & Della-Bona, A. (2007). Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). *Revista Odonto Ciência*, 22(58), 311-316.
- Elfallah, H. M., & Swain, M. V. (2013). A review of the effect of vital teeth bleaching on the mechanical properties of tooth enamel. *The New Zealand Dental Journal*, 109(3), 87-96.
- Fuentes, V., Toledano, M., Osorio, R., & Carvalho, R. M. (2003). Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research*, 66(4), 850-853.
- Ghersel, E. L., Guedes-Pinto, A. C., & Ciamponi, A. L. (2001). Influência do modo de armazenamento na microinfiltração de dentes decíduos restaurados com diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 15(1), 29-34.
- Goodis, H., Marshall JR, G., White, J., Gee, L., Hornberger, B., & Marshall, S. (1993). Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths. *Dental Materials*, 9(2), 79-84.
- Goodis, H. E., Jr, G. W., & White, J. M. (1991). The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 36(8), 561-566.

- Gutiérrez-Salazar, M. D., & Reyes-Gasga, J. (2003). Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research Ibero-american Journal of Materials*, 6(3), 367-373.
- Habelitz, S., Jr., G. W., Balooch, M., & Marshall, S. J. (2002). Nanoindentation and storage of teeth. *Journal of Biomechanics*, 35(7), 995-998.
- Humel, M. M., Oliveira, M. T., Cavalli, V., & Gianni, M. (2007). Effect of storage and disinfection methods of extracted bovine teeth on bond strength to dentin. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 6(22), 1402-1406.
- ISO 3738-1:1982. *Hardmetals – Rockwell hardness test (Scale A) – Part 1: Test method*. (1982). Genebra, Suíça.
- ISO 3878-1:1983. *Hardmetals – Vickers hardness test*. (1983). Genebra, Suíça.
- ISO 9385:1990. *Glass and glass-ceramics – Knoop hardness test*. (1990). Genebra, Suíça.
- ISO/TS 11405:2003. *Dental materials – Testing of adhesion to tooth structure*. (2003). Genebra, Suíça.
- ISO 4545-1:2005. *Metallic materials – Knoop hardness test – Part 1: Test method*. (2005). Genebra, Suíça.
- ISO 6506-1:2005. *Metallic materials – Brinell hardness test – Part 1: Test method*. (2005). Genebra, Suíça.
- ISO 6507-1:2005. *Metallic materials – Vickers hardness test – Part 1: Test method*. (2005). Genebra, Suíça.
- ISO 6508-1:2005. *Metallic materials – Rockwell hardness test – Part 1: Test method*. (2005). Genebra, Suíça.
- ISO 14705:2008. *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) – Test method for hardness of monolithic ceramics at room temperature*. (2008). Genebra, Suíça.

- ISO 26443:2008. *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) – Rockwell indentation test for evaluation of adhesion of ceramic coatings*. (2008). Genebra, Suíça.
- ISO 4049:2009. *Dentistry – Polymer-based restorative materials*. (2009). Genebra, Suíça.
- ISO 22394:2010. *Hardmetals – Knoop hardness test*. (2010). Genebra, Suíça.
- ISO 29022:2013. *Dentistry – Adhesion – Notched-edge shear bond strength test*. (2013). Genebra, Suíça.
- Joiner, A. (2007). Review of the effects of peroxide on enamel and dentin properties. *Journal of Dentistry*, 35(12), 889-896.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 4ª edição. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Kinney, J. H., Balooch, M., Marshall, S. J., Marshall, G. W., & Weihs, T. P. (1996). Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin. *Journal of Biomedical Engineering*, 118(1), 133-135.
- Kitasako, Y., Burrow, M. F., Nikaido, T., & Tagami, J. (2000). The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dental Materials*, 16(1), 1-6.
- Kumar, G. S., (2009). *Orban's Oral Histology & Embryology*. 13ª edição. Tamil Nadu, Índia: Elsevier.
- Kumar, M., Sequeira, P. S., Peter, S., & Bhat, G. K. (2005). Sterilisation of extracted human teeth for educational use. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(4), 256-258.
- Low, L., Duraman, N., & Mahmood, U. (2008). Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Materials Science and Engineering: C*, 28(2), 243-247.

- Maranhão, K. M., Klautau, E. B., Pereira, P. M., Guimarães, R. B., & Pantoja, V. G. (2009). The effect of storage solutions on enamel of bovine teeth. *Salusvita*, 28(2), 129-134.
- Marshall, G. W., Habelitz, S., Gallagher, R., Balooch, M., Balooch, G., & Marshall, S. J. (2001). Nanomechanical Properties of Hydrated Carious Human Dentin. *Journal of Dental Research*, 22(4), 352-357.
- Martin, R. B., & Boardman, D. L. (1993). The effect of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *Journal of Biomechanics*, 26(9), 1047-1054.
- Mecholsky Jr., J. J. (1995). Fracture mechanics principles. *Dental Materials*, 11(2), 111-113.
- Meredith, N., Sherriff, M., Setchell, D. J., & Swanson, S. A. (1996). Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology*, 41(6), 539-545.
- Mobarak, E. H., El-Badrawy, W., Pashley, D. H., & Jamjoom, H. (2010). Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 104(2), 92-97.
- Moura, J. S., Rodrigues, L. K., Cury, A. A., Lima, E. M., & Garcia, R. M. (2004). Influence of storage solution on enamel demineralization submitted to pH cycling. *Journal of Applied Oral Science*, 12(3), 205-208.
- Olesiak, S. E., Oyen, M. L., & Ferguson, V. L. (2010). Viscous-elastic-plastic behavior of bone using Berkovich nanoindentation. *Mechanics of Time-Dependent Materials*, 14(2), 111-124.
- Park, Y. W., Park, S. H., Kim, J. W., & Cho, K. M. (2006). The effects of tooth bleaching agents on microhardness of enamel *in situ*. *Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*, 31(6), 470-476.
- Park, S., Quinn, J. B., Romberg, E., & Arola, D. (2008). On the brittleness of enamel and selected dental materials. *Dental Materials*, 24(11), 1477-1485.

- Pimentel, E. (2002). Armazenamento de dentes extraídos para estudos *in vitro*: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Odontologia*, 59(4), 224-226.
- Raum, K., Kempf, K., Hein, H. J., Schubert, J., & Maurer, P. (2007). Preservation of microelastic properties of dentin and tooth enamel in vitro – A scanning acoustic microscopy study. *Dental Materials*, 23(10), 1221-1228.
- Samaranayake, P. (2012). *Essential Microbiology for Dentistry*. 4ª edição. Londres, Inglaterra: Elsevier.
- Santana, F. R., Pereira, J. C., Pereira, C. A., Neto, A. J., & Soares, C. J. (2008). Influence of method and period of storage on the microtensile bond strength of indirect composite resin restorations to dentine. *Brazilian Oral Research*, 22(4), 352-357.
- Secilmis, A., Dilber, E., Gokmen, F., Ozturk, N., & Telatar, T. (2011). Effects of storage solutions on mineral contents of dentin. *Journal of Dental Sciences*, 6(4), 189-194.
- Secilmis, A., Dilber, E., Ozturk, N., & Yilmaz, F. G. (2013). The effects of storage solutions on mineral content of enamel. *Materials Sciences and Applications*, 4(7), 439-445.
- Silva, M. F., Mandarino, F., Sassi, J. F., Menezes, M., Centola, A. L., & Nonaka, T. (2006). The influence of storage and sterilization methods more used in tests of adhesive resistance with extracted teeth. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 18(2), 175-180.
- Stack, M. V. (1951). Organic constituents of dentine. *British Dental Journal*, 90(7), 173-181.
- Stack, M. V. (1955). The chemical nature of the organic matrix of bone, dentin, and enamel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 60(5), 585-595.
- Strawn, S. E. (1996). Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions – short term. *Journal of Dentistry*, 24(6), 417-423.

- Sultana, S., Nikaido, T., Asafujjoha, M., Tagami, J., & Matin, K. (2006). Storage media to preserve dentin and their effects on surface properties. *Chinese Journal of Dental Research*, 6, 123-129.
- Wang, L., Alpino, P. H., Lopes, L. G., & Pereira, J. C. (2003). Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. *Journal of Applied Oral Science*, 11(3), 162-167.
- Weig, K. M., Costa, M. F., & Neto, C. A. (2001, Novembro). *Avaliação das propriedades mecânicas do dente através da microdureza instrumentada*. Comunicação apresentada no Painel PEMM na COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- Wongkhantee, S., Patanapiradej, V., Maneecut, C., & Tantbirojn, D. (2006). Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *Journal of Dentistry*, 34(3), 214-220.
- Xavier, A. F., Cavalcanti, A. L., Montenegro, R. V., & Melo, J. B. (2010). *In vitro* Evaluation of Dental Enamel Microhardness after Exposure to Isotonic Beverages. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 10(2), 145-150.
- Xie, Z., Swain, M., & Hoffman, M. (2009). Structural Integrity of Enamel: Experimental and Modeling. *Journal of Dental Research*, 88(6), 529-533.
- Xu, H. H., Smith, D. T., Jahanmir, S., Romberg, E., Kelly, J. R., Thompson, V. P., & Rekow, E. D. (1998). Indentation Damage and Mechanical Properties of Human Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research*, 77(3), 472-480.





## ANEXO 1



27

Ex.ma Senhora

**Andréa Cristine Magni Teixeira Amaral**

Monte de Caparica, 24 de março de 2014

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "*Avaliação da influência dos meios de armazenamento nas propriedades mecânicas do esmalte de dentes permanentes*", foi aprovado por unanimidade.

Queira aceitar os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

c.c. – Prof. Doutor Pedro Melo e Moura

